

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Mihaela Šrajbek

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s
dodatkom saharoze

završni rad

Osijek, 2015.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet

Kemija hrane

**Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih
tvari s dodatkom saharoze**

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Studentica: Mihaela Šrajbek

MB: 3671/12

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Predano:

Pregledano:

Ocjena:

Potpis mentora:

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom saharoze

Sažetak

U radu je ispitivana antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom saharoze te međusobni utjecaj fenolnih tvari na antioksidativnu aktivnost odnosno sinergijski učinak. Fenolne tvari koje su ispitivane su katehin, kvercetin i galna kiselina te njihove kombinacije. Za određivanje antioksidativne aktivnosti primijenjene su ABTS, DPPH i FRAP metode. Navedenim metodama utvrđeno je da otopina katehina, kvercetina i galne kiseline s dodatkom saharoze ima najveću antioksidativnu aktivnost. Najmanju antioksidativnu aktivnost imaju uzorci pojedinačnih fenolnih tvari. ABTS i DPPH metodom najmanju antioksidativnu aktivnost ima otopina katehin. Najmanju antioksidativnu aktivnost FRAP metodom ima otopina galne kiseline. Sinergijski učinci kod ABTS, DPPH i FRAP metode različiti su za različite uzorke.

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost, katehin, kvercetin, galna kiselina, saharoza, ABTS, DPPH, FRAP, sinergijski učinak

Antioxidant activity of model solutions of phenolic compounds with the addition of sucrose

Summary

The subject of this work was evaluation of antioxidant activity of model solutions of phenolic compounds with addition of sucrose and mutual influence of phenolic substances on an antioxidant activity i.e. synergistic effect. Phenolic compounds which have been tested were catechin, quercetin, gallic acid and their combinations. ABTS, DPPH and FRAP methods have been applied to determine antioxidant activity. Using ABTS, DPPH and FRAP methods it has been found that solution of catechin, quercetin and gallic acid with addition of sucrose had the highest antioxidant activity. Samples of single phenolic substances have the lowest antioxidant activity. According to the results obtained via the ABTS and DPPH methods, the solution of catechin has the lowest antioxidant activity. According the results obtained via the FRAP method, the solution of gallic acid has the lowest antioxidant activity. Synergistic effects of ABTS, DPPH and FRAP methods have been different for different samples.

Key words: antioxidant activity, catechin, quercetin, gallic acid, sucrose, ABTS, DPPH, FRAP, synergistic effect

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. POLIFENOLI	2
2.1.1. Kemijska struktura polifenolnih spojeva	2
2.1.1.1. Flavonoidi	2
2.1.1.2. Neflavonoidi	4
2.1.2. Veza između strukture polifenola i antioksidativne aktivnosti	4
2.1.2.1. Hidroksilne grupe	4
2.1.2.2. 2,3-dvostruka veza i 4-keto-skupina	6
2.1.2.3. O-metilacija	6
2.1.2.4. Glikozidacija	6
2.1.2.5. Stupanj polimerizacije	7
2.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	7
2.3. SAHAROZA	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. ZADATAK	10
3.2. KEMIKALIJE	10
3.3. PRIPREMA UZORKA	11
3.4. METODE	11
3.4.1. ABTS metoda	12
3.4.2. DPPH metoda	12
3.4.3. FRAP metoda	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST MODELNIH OTOPINA FENOLNIH TVARI S DODATKOM SAHAROZE	15
4.2. SINERGIJSKI UČINAK	17
4.2.1. Sinergijski učinak kod ABTS metode	17
4.2.2. Sinergijski učinak kod DPPH metode	18
4.2.3. Sinergijski učinak kod FRAP metode	19
5. ZAKLJUČCI	21
6. LITERATURA	22

1. UVOD

U posljednje se vrijeme zanimanje za antioksidanse povećalo zbog njihovog povoljnog utjecaja na zdravlje. Antioksidansi reduciraju, odnosno vežu slobodne radikale te na taj način sprečavaju oštećenja uzrokovana oksidacijom *in vivo* i *in vitro* (Kaur i Kapoor, 2001.; Shahidi i Zhong, 2007.). U hrani antioksidansi sprečavaju ili odgađaju autooksidaciju i formiranje nepoželjne arome, kao i smanjenje nutritivne vrijednosti hrane (Shahidi i Zhong, 2007.). Polifenolni spojevi, koji su sekundarni metaboliti biljaka posjeduju mnoga biološka svojstva, uključujući i antioksidativnu aktivnost (Gharras, 2009.). Nalaze se u velikom broju ljekovitih biljaka, a koncentrirani su u sjemenkama, lišću, cvijeću te na koži ili kori drveća (Kazazić, 2004.). Polifenoli su važni za aromu, boju i nutritivna svojstva voća i povrća i time imaju važnu ulogu u kvaliteti voća i povrća, kao i njihovih prerađevina. Stoga je bitno, tijekom procesiranja i skladištenja prehrambenih proizvoda poznavati stabilnost polifenolnih spojeva. Neki od čimbenika koji utječu na stabilnost voća i povrća su prisustvo kisika, svjetlosti, temperatura, pH vrijednost te sastav hrane. No, u novije vrijeme, sve je češći dodatak ekstrakata bogatim polifenolnim spojevima u prehrambene proizvode ne bi li se povećala nutritivna vrijednost, odnosno kvaliteta prehrambenih proizvoda (Gharras, 2009.).

Cilj rada je odrediti antioksidativnu aktivnost otopina fenolnih tvari s dodatkom saharoze te utvrditi da li postoji sinergijski učinak kod njihovih kombinacija. Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je ABTS, DPPH i FRAP metodama. Na temelju rezultata dobivenih navedenim metodama određen je sinergijski učinak fenolnih tvari u odgovarajućim uzorcima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLI

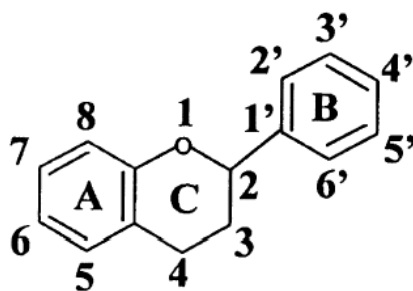
Pojam polifenoli obuhvaća niz kemijskih spojeva različite kemijske strukture (Cheynier, 2005.). Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka (Gharras, 2009.) te u biljnom svijetu čine jednu od najbrojnijih i najšire rasprostranjenih skupina spojeva, s više od 8000 trenutačno poznatih struktura. Kod biljaka pozitivno utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima, štite osjetljive stanične dijelove od štetnog zračenja te neki polifenoli indirektno utječu na rast biljke. Zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti i mogućem pozitivnom učinku na zdravlje ljudi, kao i u tretmanu i prevenciji zloćudnih bolesti, polifenoli su u posljednje vrijeme dobili veliko značenje. Mnoga istraživanja pokazala su antikancerogeno, antihepatoksično, protuupalno, antivirusno, antibakterijsko i antialergijsko djelovanje određenih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadrže. Značajan izvor polifenola, osim voća i povrća, su i prerađevine na bazi voća i povrća (vino, sokovi, ...) te razne druge namirnice poput čajeva, kakaa i dr. (Šubarić i sur., 2010.).

2.1.1. Kemijska struktura polifenolnih spojeva

Zbog strukturne raznolikosti polifenolnih spojeva moguće ih je podijeliti u nekoliko grupa ovisno o podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj aktivnosti (Tsao, 2010.). No, općenito se dijele u dvije glavne grupe: flavonoidi i neflavonoidi (Andrés-Lacueva i sur., 2010.).

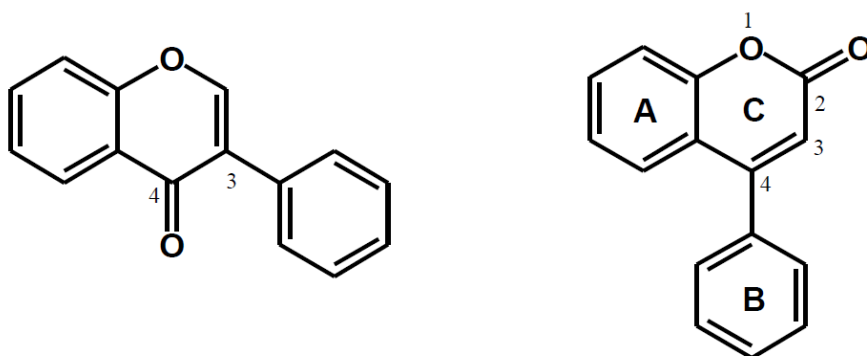
2.1.1.1. *Flavonoidi*

Flavonoidi su najzastupljenija i najveća skupina polifenola. Na **Slici 1** prikazana je osnovna struktura flavonoida koju čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol. Odnosno, osnovnu strukturu čine tri fenolna prstena: A, B i C prsten. Benzenski prsteni A i B povezani su preko tročlanog alifatskog niza, koji zajedno sa kisikom tvori šesteročlani prsten C (Kazazić, 2004.).

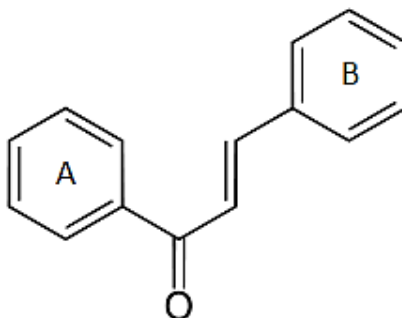


Slika 1 Osnovna struktura flavonoida (Heim i sur., 2002.)

Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko podskupina. Ovisno o stupnju hidroksilacije i rasporedu u C prstenu podijeljeni su na antocijane, flavan-3-ole, flavone, flavanone i flavonole. Dok velika većina flavonoida ima na C2 poziciji prstena C vezan prsten B, u nekih flavonoida kao što su izoflavoni i neoflavonoidi prsten B vezan je na C3 i C4 poziciji prstena C (**Slika 2**). Halkoni, iako im nedostaje heterociklički prsten C, također su svrstani u skupinu flavonoida (**Slika 3**) (Tsao, 2010.).



Slika 2 Struktura izoflavona (lijevo); struktura neoflavonoida (desno) (Tsao, 2010.)



Slika 3 Struktura halkona (Tsao, 2010.)

Navedene osnovne strukture flavonoida se nazivaju aglikoni. Međutim, u biljkama se većina flavonoida nalazi u obliku glikozida. Glikozid nastaje vezanjem različitih molekula šećera na aglikon. Osim molekula šećera, na aglikon mogu biti vezani i acilirani šećeri. Dakle, glikozidi se osim različitih supstituenata razlikuju i po mjestu vezanja tih supstituenata (Tsao, 2010.).

2.1.1.2. Neflavonoidi

U neflavonoide se ubrajaju: jednostavni fenoli, fenolne kiseline, hidrolizirajući tanini, acetofenoni, hidroksicinamična kiselina, kumarini, lignani te mnogi drugi. Svaka od podskupina ima vezanu neku supstitucijsku skupinu. Jednostavni fenoli imaju supstituirani alkohol na aromatski prsten; fenolne kiseline imaju na benzen vezanu karboksilnu skupinu; hidrolizirajući tanini su glukozni esteri galne kiseline; itd. (Tsao i McCallum, 2010.).

2.1.2. Veza između strukture polifenola i antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost polifenola pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala, kelatnog vezanja Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+} iona, aktiviranje antioksidacijskih enzima (Kazazić, 2004.) i inhibiranja niz enzima, kao što su lipooksigenaza, ciklooksigenaza, monooksigenaza, protein kinaza i dr. (Cao i sur., 1997.). Ovisno o strukturnom rasporedu funkcionalnih grupa na glavnoj okosnici polifenola ovisi i njihova antioksidativna aktivnost, svojstvo hvatanja radikala te stvaranje kelatnih kompleksa (Cao i sur., 1997.; Kazazić, 2004.).

2.1.2.1. Hidroksilne grupe

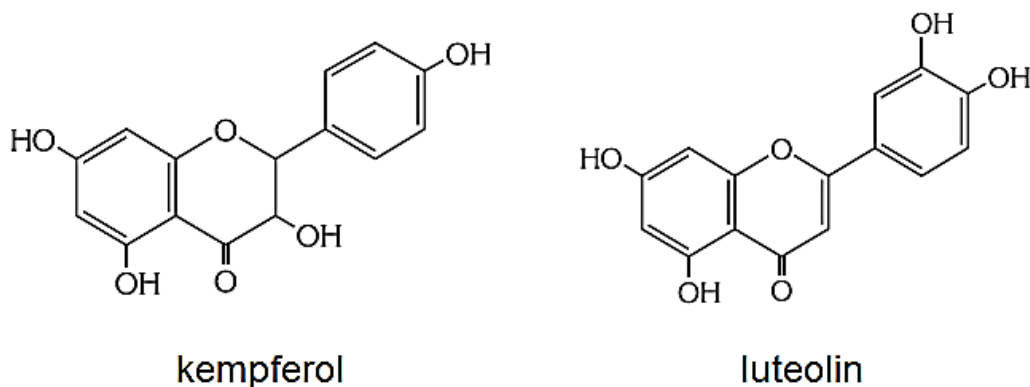
Konfiguracija i broj hidroksilnih grupa uvelike utječu na mehanizam antioksidativne aktivnosti. Kapacitet hvatanja slobodnih radikala se pripisuje visokoj reaktivnosti hidroksilnih grupa koje sudjeluju u reakciji **(1)**.



U hvatanju reaktivnih čestica kisika i reaktivnih čestica dušika najznačajnija je hidroksilacija B prstena. Zbog doniranja vodika i elektrona, hidroksilna skupina B prstena stabilizira hidroksil,

peroksil i peroksinitril radikale, a ujedno nastaje i relativno stabilan flavonoidni radikal (Kazazić, 2004.).

B prsten sa samo jednom OH skupinom nije efikasan donor vodika. Također, ni prisutnost treće OH skupine na prstenu B ne povećava antioksidativnu aktivnost. Međutim, ako je prisutna 3',4'-katehol struktura, ona oksidira na B prstenu te delokalizacijom elektrona daje stabiliziran o-semikinonski radikal. 3',4'-katehol struktura B prstena povećava inhibiciju peroksidacije lipida (Kazazić, 2004.). Naročito je važna u hvatanju peroksil, superoksid i peroksinitril radikala. Naime, luteolin koji ima četiri OH skupine te 3',4'-kateholnu strukturu ima puno veću sposobnost hvatanja peroksil radikala od kempferola, koji također ima četiri OH skupine, ali nema 3',4'-kateholnu strukturu (**Slika 4**) (Cao i sur., 1997.). Flavoni koji nemaju 3',4'-katehol strukturu stvaraju relativno nestabilne radikale i slabi su hvatači (Kazazić, 2004.).



Slika 4 Utjecaj 3',4'-kateholne strukture na antioksidativnu aktivnost (Kazazić, 2004.)

Utjecaj rasporeda OH skupina prstena A na antioksidativnu aktivnost manje je poznat (Kazazić, 2004.).

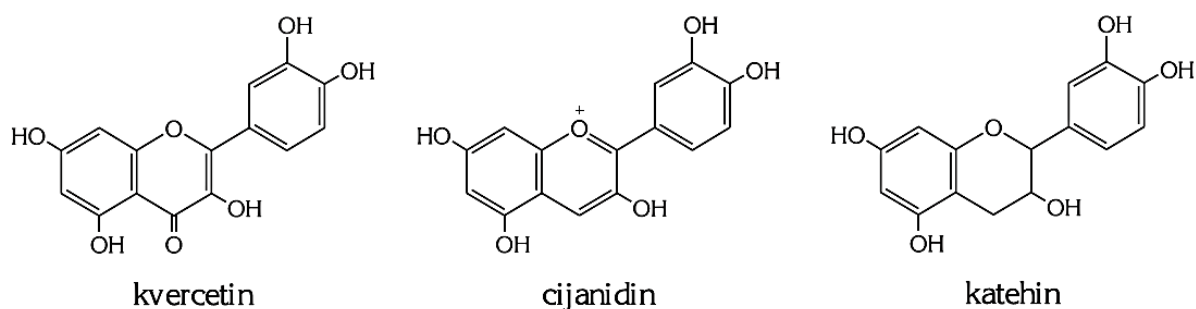
Smatra se da prsten C doprinosi antioksidativnoj aktivnosti na dva načina:

1. prisutnošću slobodne OH skupine u položaju 3- i
2. omogućavanjem konjugacije između aromatskih prstenova.

Sam prsten C nije presudan za aktivnost flavonoida. No, nadmoć kvercetina u inhibiciji oksidativnih oštećenja pripisuje se njegovoj slobodnoj OH skupini u položaju 3- koja povećava stabilnost flavonoidnog radikala. Kvercetin je zbog prisutne OH skupine u položaju 3- planaran te je zbog planarnosti omogućena konjugacija i delokalizacija elektrona, a time i povećana stabilnost flavonoidnih fenoksilnih radikala (Kazazić, 2004.).

2.1.2.2. 2,3-dvostruka veza i 4-keto-skupina

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala se povećava postojanjem 2,3-dvostruke veze i 4-keto-skupine. Konjugacijom dvostrukih veza između A i B prstena dolazi do rezonancijske stabilizacije preko većeg broja aromatskih jezgara pa i povećanja stabilnosti flavonoidnih radikala. **Slika 5** pokazuje tri flavonoida sa istim brojem i jednakim rasporedom OH skupina, ali razlikom u C prstenu. Kvercetin koji ima 2,3-dvostruku vezu i 4-keto skupinu pokazuje veliku antioksidativnu aktivnost, kao i cijanidin sa svojim antocijanidinskim prstenom, dok katehin sa zasićenim C prstenom ima manju antioksidativnu aktivnost (Kazazić, 2004.).



Slika 5 Usporedba strukture i antioksidativne aktivnosti (Kazazić, 2004.)

2.1.2.3. O-metilacija

Zbog razlike u hidrofobnosti i molekularne planarnosti, hidroksilirani flavonoidi imaju bolju antioksidativnu aktivnost od metiliranih. Tako je npr. kvercetin bolji hvatač peroksidnih radikala od njegovih O-metiliranih i O-glikozidiranih derivata. O-metiliranjem narušava se planarnost i time smanjuje antioksidativna aktivnost. S 4'-O-metiliranjem kateholne strukture značajno se smanjuje antioksidativna sposobnost. No, utjecaj O-metiliranja ovisi o metodi određivanja antioksidativne aktivnosti, tipu radikala koji se koristi i slučaju kada tvar koja se oksidira ima strukturu lipida, jer tada lipofilnost pridonosi ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti (Kazazić, 2004.).

2.1.2.4. Glikozidacija

Aglikoni su snažniji antioksidansi od odgovarajućih glikozida. Također, s porastom broja glikozidnih skupina antioksidativno svojstvo flavonskih glikozida se smanjuje. Osim prisutnosti

i broja glikozidnih skupina bitan je i položaj te struktura šećera (Kazazić, 2004.). Najčešće su glikozidne jedinice vezane na 3- ili 7- poziciji, no moguće je i vezanje šećera na A prsten čime dolazi do većeg smanjenja antioksidativne aktivnosti. Glikozidacija narušava planarnost B prstena te time smanjuje sposobnost delokalizacije elektrona (Van acker i sur., 1996.). Osim toga, šećer okupira slobodnu OH grupu koja je neophodna za hvatanje radikala i mijenja hidrofilnost molekule te se na taj način smanjuje dostupnost za radikale lipida. Međutim, utjecaj šećera na antioksidativnu aktivnost u našem tijelu je upitan, jer se šećer u tijelu odvaja od flavonoidne okosnice (Heim i sur., 2002.).

2.1.2.5. Stupanj polimerizacije

Antioksidativna aktivnost polimernih flavonoida je teško razumljiva. Superoksid anioni procijanidnih dimera i trimera su učinkovitiji od superoksid aniona monomera. Tetrameri su učinkovitiji nego trimeri kad su u pitanju peroksinitril i superoksid radikali. Također, heptameri i heksameri imaju znatno veću antioksidativnu aktivnost od trimera i tetramera. Osim do određenog stupnja polimerizacije, može se zaključiti da dolazi i do povećanja antioksidativne aktivnosti (Vennat i sur., 1994.).

2.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Ako izostane antioksidativna zaštita protiv nastalih slobodnih radikala, može doći do oksidativnog stresa zbog djelovanja određenih toksina ili fiziološkim stresom. Slobodni radikali uključeni su u razvojne procese brojnih bolesti, također pridonose starenju stanica, mutagenezi, karcinogenezi te koronarnim bolestima srca (Kazazić, 2004.).

Mnoga istraživanja pokazala su da su kronične bolesti povezane s oksidativnim stresom uzrokovanim reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima (Tsao, 2010.). Također, pokazalo se da su polifenolni spojevi izolirani iz biljaka puno učinkovitiji antioksidansi *in vitro* od vitamina E i C, stoga mogu značajno doprinijeti zaštitnim učincima *in vivo* (Gharras, 2009.).

S obzirom na način djelovanja, antioksidansi se mogu podijeliti u dvije grupe:

1. primarni antioksidansi i

2. sekundarni antioksidansi.

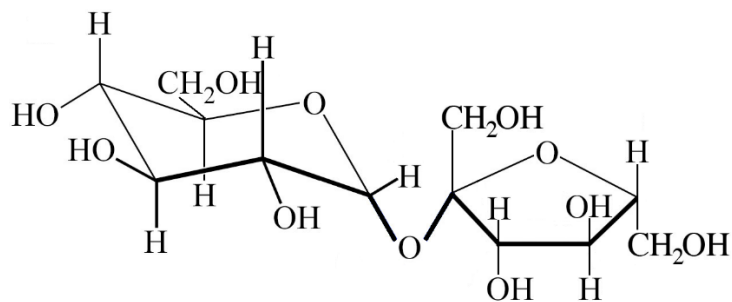
Primarni antioksidansi direktno hvataju slobodne radikale. Mehanizam djelovanja sekundarnih antioksidansa ne uključuje direktno hvatanje slobodnih radikala, već oni djeluju na nekoliko načina: vezanje metalnih iona, vezanje kisika, pretvaranje hidroperoksida u neradikalne vrste, apsorpcija UV radijacije i deaktivacija singleton kisika (Pokorny, 2001.).

Antioksidativna aktivnost polifenolnih spojeva ovisi o njihovoj sposobnosti da otpuste vodik ili elektron te sposobnosti delokalizacije nesparenog elektrona u aromatskoj strukturi (Villaño i sur., 2004.). Polifenoli, kao antioksidansi moraju zadovoljiti dva uvjeta. Prvi uvjet je da moraju usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije, ako su prisutni u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji. Drugi uvjet uključuje da nastali radikal mora biti stabilan, kako ne bi poticao lančanu reakciju. Radikali se stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Također, interakcijom polifenola s drugim fiziološkim antioksidansima postiže se sinergijski učinak i povećanje antioksidativne aktivnosti (Kazazić, 2004.).

Unos velikih količina voća, povrća te cijelih zrna žitarica, koji su bogati polifenolima povezan je sa smanjenjem rizika pojave kroničnih i degenerativnih bolesti (Tsao, 2010.). Osim prirodnih antioksidansa, u praksi se koriste i sintetski antioksidansi. Iako se sintetski antioksidansi koriste kao aditivi, nadomjesci i lijekovi, opće prihvaćena činjenica je da su prirodni antioksidansi učinkovitiji i sigurniji (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001.).

2.3. SAHAROZA

Saharoza je disaharid kemijske formule $C_{12}H_{22}O_{11}$. Sastoji se od α -D-glukoze i β -D-fruktoze povezanih glikozidnom vezom (**Slika 6**). Dvije hidroksilne skupine na molekuli međusobno su povezane u obliku etera pa je saharoza nereducirajući šećer (Babić, 2007.).



Slika 6 Strukturni prikaz molekule saharoze (Pine i sur., 1994.)

Saharoza kristalizira u monoklinskom sustavu. Kristal saharoze je složen i predstavlja kombinaciju šest kristalografskih oblika. Tali se pri temperaturama od 185 do 186 °C, a prisutnost nečistoća snižava točku taljenja saharoze. Saharoza je topljiva u vodi, a netopljiva u većini organskih otapala. Topljivost saharoze, osim o temperaturi ovisi i o udjelu stranih primjesa. Mala količina primjesa smanjuje topljivost saharoze, dok velika količina povećava njenu topljivost. Također, porastom temperature raste i topljivost saharoze. Osim toga, viskoznost otopine saharoze ovisi o temperaturi otopine te koncentraciji saharoze. Porastom koncentracije viskoznost raste, a porastom temperature viskoznost opada. Saharoza sadrži više asimetričnih ugljikovih atoma, zbog toga je optički aktivna te skreće ravan polarizirane svjetlosti u desno (Babić, 2007.).

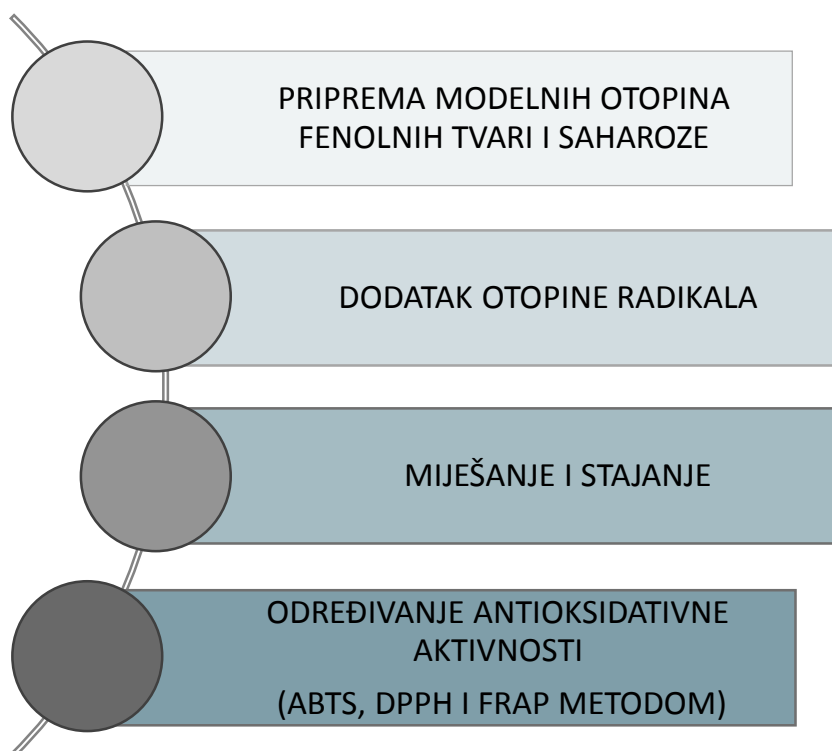
Široko je rasprostranjena u biljnom svijetu, nalazi se u staničnom soku mnogih biljaka. Uglavnom se proizvodi iz šećerne repe i šećerne trske. Prije svega, saharoza se koristi kao sladilo, zatim kao sredstvo za konzerviranje brojnih prehrambenih proizvoda, a upotrebljava se kako u prehrambenoj industriji tako i u kućanstvima. Dobro je topljiva u vodi, ima ugodan sladak okus, a u organizmu se potpuno resorbira (Babić, 2007.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je:

1. Odrediti antioksidativnu aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari (pojedinačno ili u kombinacijama) s dodatkom saharoze primjenom DPPH, ABTS i FRAP metoda.
2. Utvrditi sinergijski učinak fenolnih komponenata.



Slika 7 Shematski prikaz rada

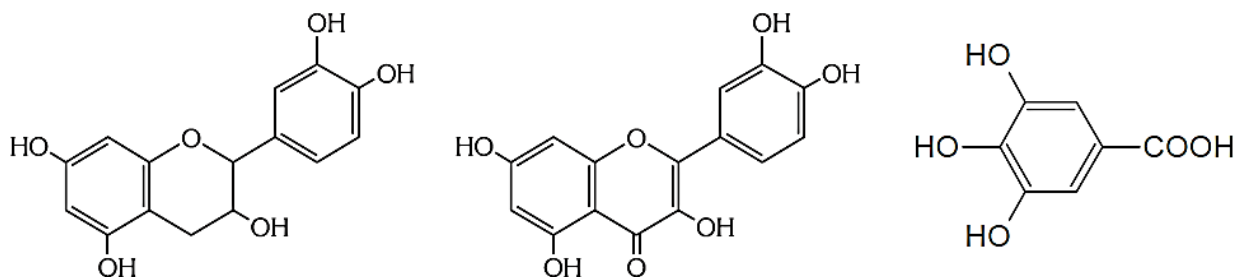
3.2. KEMIČALIJE

U radu su se za istraživanje koristili:

- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS), Sigma, Njemačka,
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma, Njemačka,
- 2,4,6-tri2piridil-s-triazin (TPTZ), Sigma, Njemačka,
- Željezo klorid, Sigma, Njemačka,
- Saharoza, Kemika, Zagreb,

- Trolox, Sigma, Njemačka,
- Metanol, Kemika, Zagreb,
- Katehin, Sigma, Njemačka,
- Kvercetin, Sigma, Njemačka i
- Galna kiselina, Sigma, Njemačka.

Na **Slici 8** prikazane su strukturne formule katehina, kvercetina i galne kiseline.



Slika 8 Strukturna formula katehina (lijevo), kvercetina (u sredini) (Kazazić, 2004.) i galne kiseline (desno) (Rein, 2005.)

3.3. PRIPREMA UZORKA

Antioksidativna aktivnost ispitivana je na sljedećim uzorcima:

- otopina katehina s dodatkom saharoze (K), otopina kvercetina s dodatkom saharoze (Q) te otopina galne kiseline s dodatkom saharoze (G),
- otopina katehina i kvercetina s dodatkom saharoze (KQ), otopina katehina i galne kiseline s dodatkom saharoze (KG) te otopina kvercetina i galne kiseline s dodatkom saharoze (QG) i
- otopina katehina, kvercetina i galne kiseline s dodatkom saharoze (KQG).

3.4. METODE

Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa u hrani je uklanjanje slobodnih radikala. Za određivanje antioksidativne aktivnosti razvijeno je nekoliko metoda na osnovi uklanjanja slobodnih radikala u polarnom organskom otapalu (npr. metanolu) pri sobnoj temperaturi.

Najčešće se koriste 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) te FRAP metode.

3.4.1. ABTS metoda

ABTS metoda temelji se na raspadanju $ABTS^{\bullet+}$ koji nastaje oksidacijom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. $ABTS^{\bullet+}$ je relativno stabilan u odsustvu fenolnih tvari, ali u prisustvu donora H^+ brzo reagira i prelazi u nebojeni oblik ABTS-a (Arnao i sur., 2001.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS (**Slika 9**). Smjesa se dobro promiješa i ostavi reagirati 1 h i 35 min u mraku. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 734 nm. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Određivanje je provedeno u tri paralele.



Slika 9 Reakcijska smjesa uzorka i otopine ABTS

3.4.2. DPPH metoda

Kod DPPH testa, uklanjanje $DPPH^{\bullet}$ radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije pri 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s radikalima. Reakcije su prikazane u prikazu **(2)** i **(3)** (Brand-Williams i sur., 1995.).



Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL otopine DPPH (**Slika 10**). Dobro se promiješa te se reakcijska smjesa ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Određivanje je provedeno u tri paralele.



Slika 10 Reakcijska smjesa uzorka i otopine DPPH

3.4.3. FRAP metoda

U FRAP metodi se prati redukcija Fe^{3+} iona (feri oblik) u Fe^{2+} ion (fero oblik) u prisutnosti antioksidansa. Nastali ion u prisutnosti TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorbancije pri 593 nm (Roginsky i Lissi, 2005.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i doda 3 mL FRAP otopine (**Slika 11**). Reakcijska smjesa se dobro promiješa i ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Određivanje je provedeno u tri paralele.



Slika 11 Reakcijska smjesa uzorka i FRAP otopine

4. REZULTATI I RASPRAVA

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina određena je ABTS, DPPH te FRAP metodom. Prikazana je antioksidativna aktivnost otopina pojedinih fenolnih tvari, odnosno katehina, kvercetina i galne kiseline sa dodatkom saharoze, njihova kombinacija te na kraju i kombinacija svih triju.

4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST MODELNIH OTOPINA FENOLNIH TVARI S DODATKOM SAHAROZE

Dobiveni rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti modelnih otopina fenolnih tvari i saharoze prikazani su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari i saharoze određena ABTS, DPPH i FRAP metodama ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)

uzorci	ABTS	DPPH	FRAP
K	408,103 \pm 13,878	127,840 \pm 5,233	15,099 \pm 0,405
Q	458,469 \pm 8,338	232,377 \pm 3,658	3,498 \pm 0,841
G	517,461 \pm 10,506	229,716 \pm 3,183	0,624 \pm 0,195
KQ	905,828 \pm 18,115	385,868 \pm 21,547	51,916 \pm 0,457
KG	887,037 \pm 17,660	360,169 \pm 11,917	43,255 \pm 3,434
QG	988,359 \pm 28,903	441,621 \pm 20,389	91,348 \pm 10,396
KQG	1348,697 \pm 10,253	563,775 \pm 8,658	171,563 \pm 3,131

Najveću antioksidativnu aktivnost ABTS metodom imao je uzorak s kombinacijom katehina, kvercetina i galne kiseline (1348,697 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Zatim slijedi kombinacija kvercetina i galne kiseline (988,359 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), katehina i kvercetina (905,828 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) te katehina i galne kiseline (887,037 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Najmanju antioksidativnu aktivnost ABTS metodom imali su uzorci pojedinačnih fenolnih tvari. Pa tako, od pojedinačnih fenolnih tvari najveću antioksidativnu aktivnost pokazala je galna kiselina (517,461 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), zatim kvercetin (458,469 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) te na kraju katehin (408,103 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Rezultati dobiveni DPPH metodom također su pokazali da kombinacija katehina, kvercetina i galne

kiseline ima najveću antioksidativnu aktivnost (563,775 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Zatim kombinacija kvercetina i galne kiseline (441,621 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), katehina i kvercetina (385,868 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) te katehina i galne kiseline (360,169 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih fenolnih tvari dobivene DPPH metodom razlikuju se od vrijednosti dobivenih ABTS metodom. Najveću antioksidativnu aktivnost pojedinačnih fenolnih tvari DPPH metodom imao je kvercetin (232,377 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), slijedi galna kiselina (229,716 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) te na kraju katehin (127,840 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Najveću antioksidativnu aktivnost, kako ABTS i DPPH metodama, tako i FRAP metodom imala je kombinacija katehina, kvercetina i galne kiseline (171,563 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Isti poredak pokazale su i kombinacije dviju fenolnih tvari. FRAP metodom kombinacija kvercetina i galne kiseline imala je antioksidativnu aktivnost od 91,348 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$, katehina i kvercetina 51, 916 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ te katehina i galne kiseline 43,255 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih fenolnih tvari dobivene FRAP metodom razlikuju se od vrijednosti dobivenih ABTS i DPPH metodama. Najveću antioksidativnu aktivnost FRAP metodom od pojedinačnih fenolnih tvari imao je katehin (15,099 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), zatim slijedi kvercetin (3,498 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), dok je galna kiselina imala samo 0,624 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$.

Dakle, kombinacija katehina, kvercetina i galne kiseline je pokazala najveću antioksidativnu aktivnost kod svih triju metoda. Također, kod kombinacije dviju fenolnih tvari najveći antioksidativni učinak imala je kombinacija kvercetina i galne kiseline, zatim kombinacija katehina i kvercetina te na kraju kombinacija katehina i galne kiseline kod svih triju metoda. Međutim, vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih fenolnih tvari razlikuju se kod svake metode. Najveće vrijednosti antioksidativne aktivnosti svih uzoraka dobivene su ABTS metodom, zatim DPPH metodom, dok su najmanje vrijednosti dobivene FRAP metodom. Razlog tome je što su kod različitih metoda korišteni različiti slobodni radikali. Dakle, kod ABTS metode korišteni $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ima slabu selektivnost u reakcijama s donorima vodika, jer reagira s bilo kojim aromatskim spojem s hidroksilnom skupinom, bez obzira na njegov stvarni antioksidativni potencijal (Campos i Lissi, 1997.; Arts i sur., 2003.; Roginsky i Lissi, 2005.). Međutim, kod DPPH testa, DPPH^{\bullet} ne reagira s flavonoidima koji nemaju hidroksilnu skupinu na B prstenu niti s aromatskim kiselinama koje imaju samo jednu hidroksilnu skupinu (Yokozawa i sur., 1998.; Roginsky i Lissi, 2005.). Dok kod FRAP metode rezultati mogu varirati

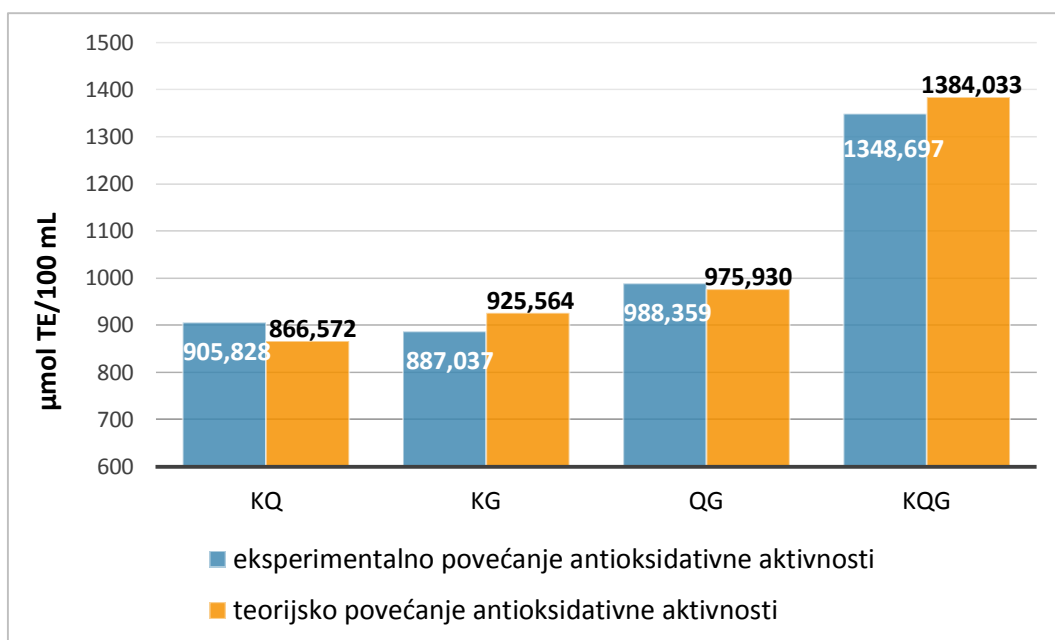
ovisno o trajanju reakcije, iz razloga što različiti antioksidansi zahtijevaju različito reakcijsko vrijeme za detekciju (Shahidi i Zhong, 2007.).

4.2. SINERGIJSKI UČINAK

Kada se usporede vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene eksperimentalno kod uzoraka katehin i kvercetin; katehin i galna kiselina; kvercetin i galna kiselina te katehin, kvercetin i galna kiselina sa teorijski dobivenim vrijednostima, odnosno sumom eksperimentalnih vrijednosti navedenih pojedinačnih fenolnih tvari, vidi se da postoje određena odstupanja. Na temelju eksperimentalnog, odnosno teorijskog povećanja antioksidativne aktivnosti može se zaključiti da li je došlo do sinergijskog učinka među pojedinim komponentama.

4.2.1. SINERGIJSKI UČINAK KOD ABTS METODE

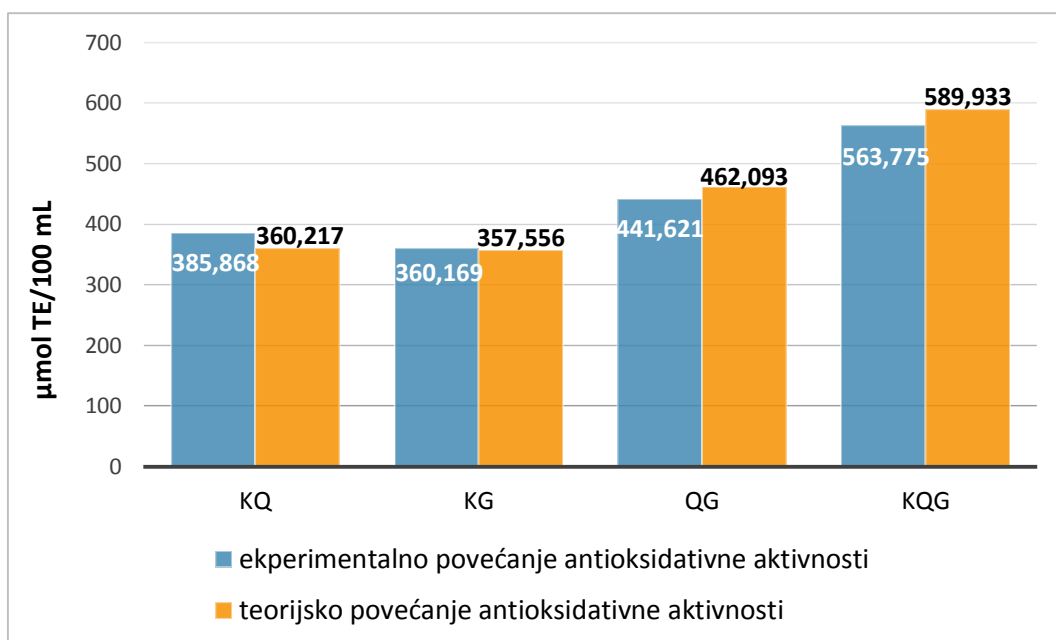
Na **Slici 12** prikazane su vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene ABTS metodom. Eksperimentalno dobivena vrijednost katehina i kvercetina iznosi 905,828 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Međutim, kada se zbroje eksperimentalno dobivena vrijednost katehina te eksperimentalno dobivena vrijednost kvercetina, dobije se vrijednost od 866,572 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Dakle, teorijski dobivena vrijednost (866,572 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) je manja od eksperimentalno dobivene vrijednosti (905,828 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), što znači da je kod katehina i kvercetina došlo do sinergijskog učinka. Kombinacija kvercetina i galne kiseline također pokazuje sinergijski učinak, zbog toga što je eksperimentalna vrijednost (988, 358 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) veća od teorijski dobivene vrijednosti (975,930 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Eksperimentalna vrijednost antioksidativne aktivnosti katehina i galne kiseline iznosi 887,037 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$, dok je teorijski dobivena vrijednost veća te iznosi 925,564 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Stoga, katehin i galna kiselina ne pokazuju sinergijski učinak. Također, ni kombinacija katehina, kvercetina i galne kiseline ne pokazuje sinergijski učinak, jer je eksperimentalno dobivena vrijednost (1348,697 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) manja od teorijski dobivene (1384,033 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$).



Slika 12 Eksperimentalno i teorijsko povećanje antioksidativne aktivnosti ABTS metodom

4.2.2. SINERGIJSKI UČINAK KOD DPPH METODE

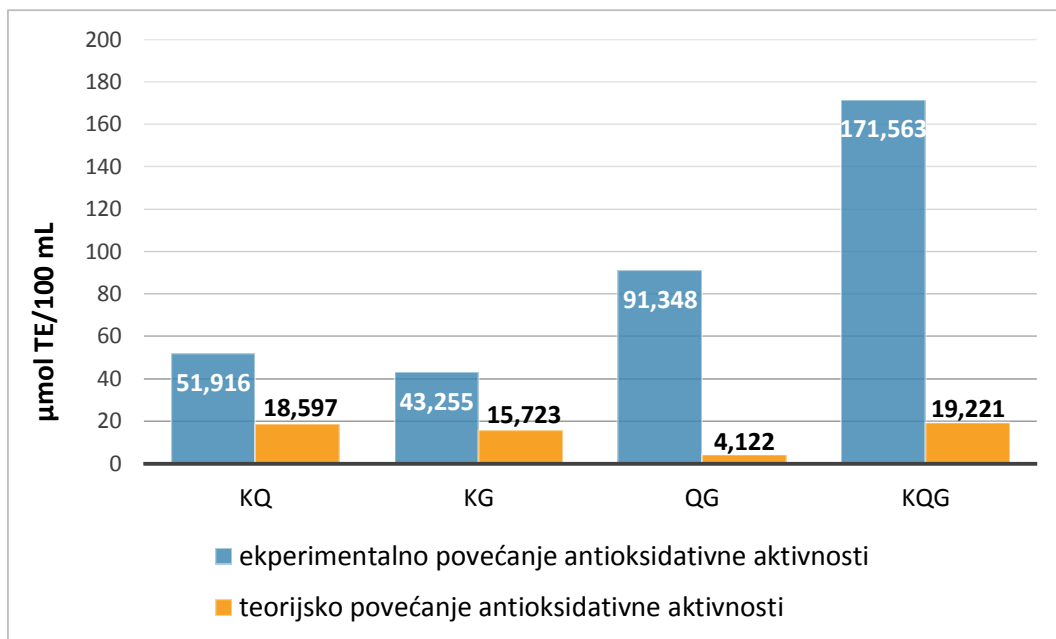
Slika 13 pokazuje eksperimentalne i teorijske vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene DPPH metodom. Kod DPPH metode sinergijski učinak pokazuju uzorci katehina i kvercetina te katehina i galne kiseline. Naime, eksperimentalna vrijednost antioksidativne aktivnosti katehina i kvercetina iznosi 385,868 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ te je veća u odnosu na teorijski dobivenu vrijednost, koja iznosi 360,217 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Isto tako, eksperimentalna vrijednost katehina i galne kiseline (360,169 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) veća je od teorijski dobivene vrijednosti (357,556 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Kombinacija kvercetina i galne kiseline te katehina, kvercetina i galne kiseline DPPH metodom nisu pokazale sinergijski učinak. Eksperimentalna vrijednost kvercetina i galne kiseline je 441,621 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$, što je manje od teorijski dobivene vrijednosti, odnosno 462,093 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Isto je eksperimentalna vrijednost antioksidativne aktivnosti katehina, kvercetina i galne kiseline (563,775 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) manja od teorijski dobivene vrijednosti (589,933 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$).



Slika 13 Eksperimentalno i teorijsko povećanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

4.2.3. SINERGIJSKI UČINAK KOD FRAP METODE

Eksperimentalne vrijednosti i teorijske vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP metodom prikazane su na **Slici 14**. FRAP metodom sva četiri uzorka pokazala su sinergijski učinak. Dakle, eksperimentalna vrijednost antioksidativne aktivnosti katehina i kvercetina je 51,916 μmol TE/100 mL, dok je teorijska vrijednost manja, a iznosi 18,597 μmol TE/100 mL. Kod kombinacije katehina i galne kiseline eksperimentalna vrijednost (43,255 μmol TE/100 mL) je veća od teorijski dobivene vrijednosti (15,723 μmol TE/100 mL). Eksperimentalna vrijednost kvercetina i galne kiseline iznosi 91,348 μmol TE/100 mL te je znatno veća od teorijske vrijednosti, koja iznosi 4,122 μmol TE/100 mL. Kod kombinacije katehina, kvercetina i galne kiseline eksperimentalna vrijednost od 171,563 μmol TE/100 mL, također je znatno veća od teorijski dobivene vrijednosti, odnosno 19,221 μmol TE/100 mL.



Slika 14 Eksperimentalno i teorijsko povećanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Antioksidativna aktivnost uzoraka ovisi o primijenjenoj metodi pa su tako rezultati dobiveni ABTS metodom najveći, zatim slijede rezultati dobiveni primjenom DPPH metode, dok su FRAP metodom dobivene najmanje vrijednosti.
2. Kod svih triju metoda najveći antioksidativni učinak je imao uzorak KQG.
3. Antioksidativna aktivnost ABTS metodom raste redoslijedom: $K < Q < G < KG < KQ < QG < KQG$.
4. Antioksidativna aktivnost DPPH metodom raste redoslijedom: $K < G < Q < KG < KQ < QG < KQG$.
5. Antioksidativna aktivnost FRAP metodom raste redoslijedom: $G < Q < K < KG < KQ < QG < KQG$.
6. Kod ABTS metode sinergijski učinak primijećen je kod sljedećih uzoraka: KQ i QG.
7. Kod DPPH metode sinergijski učinak primijećen je kod sljedećih uzoraka: KQ i KG.
8. Kod FRAP metode sinergijski učinak primijećen je kod sljedećih uzoraka: KQ, KG, QG i KQG.

6. LITERATURA

Andrés-Lacueva C, Chiva-Blanch G, Khan N, Lamuela-Raventós RM, Llorach R, Medina-Remon A, Rotches-Ribalta M, Urpi-Sarda M, Zamora R: Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. U *Fruit and vegetable phytochemicals*. Wiley-Blackwell, New Delhi, 2010.

Arnao MB, Cano A, Acosta M: The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73:239-244, 2001.

Arts MJTJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A: A critical appraisal of the use of antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry* 80:409-414, 2003.

Babić J: Utjecaj acetiliranja i dodataka na reološka i termofizikalna svojstva škroba kukuruza i tapioke. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology* 28:25-30, 1995.

Campos AM, Lissi EA: Kinetics of the reaction between 2,2'-azibobis(3-ethylbenzozolin-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cation and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics* 29:219-224, 1997.

Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22:749-760, 1997.

Cheynier V: Polyphenols in food are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81:223S-9S, 2005.

Gharras, HE: Polyphenols: food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:2512-2518, 2009.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-84, 2002.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiva Higijene Rada Toksikologije* 55:279-290, 2004.

- Kaur C, Kapoor HC: Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. Review. *International Journal of Food Science and Technology*, 36:703-725, 2001.
- Pine SH, Bregovec I, Rapić V: Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
- Pokorny J: *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Ltd, 2001.
- Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija*. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.
- Roginsky V, Lissi EA: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92:235-254, 2005.
- Shahidi F, Zhong, Y: Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. U: Antioxidant Measurement and Applications (Shahidi, F., Ho, C.H., ured.), American Chemical Society, Washington, 2007.
- Šubarić D, Kopjar M, Ačkar Đ: Polifenoli i zdravlje. U *Zbornik radova i sažetaka sa međunarodnog seminara „Dodaci prehrani u zdravlju i bolesti“*. Tuzla, 32-39, 2010.
- Tsao R: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2(12): 1231-1246, 2010.
- Tsao R, McCallum J: Chemistry of Flavonoids. U *Fruit and vegetable phytochemicals*. Wiley-Blackwell, New Delhi, 2010.
- Van Acker SABE, De Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MNJL, den Kelder GDO, van der Vijgh WJF, Bast A: A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. *Chemical Research in Toxicology*, 9:1305–1312, 1996.
- Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P: Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17:1613–1615, 1994.
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC: Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analitica Chimica Acta* 538, 391-398, 2005.
- Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. *Antioxidants in food*, eds Pokorny J, Yanishlieva N & Gordon M. Boca Raton, Florida, CRC Press 2001.

Yokozawa T, Chen P, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I: Study on the inhibitory effects of tannins and flavonoids against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology* 56:213-222, 1998.